

精蛋白胰岛素注射液无菌检查方法的建立

张光华, 江志杰*, 刘文杰(北京市药品检验所, 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: 目的 建立精蛋白胰岛素注射液的无菌检查方法。方法 根据中国药典 2015 年版四部通则 1101 无菌检查法进行方法适用性试验, 对药典收载的精蛋白胰岛素注射液无菌检查方法进行优化, 使用无微生物毒性的肝素钠溶液中和胰岛素注射液中的精蛋白, 使精蛋白胰岛素注射液由白色混悬液变为澄清透明液体, 便于薄膜过滤法处理。结果 使用薄膜过滤法, 无菌检查方法适用性试验中 6 株阳性对照菌均可正常生长。结论 建立了可行的精蛋白胰岛素注射液的无菌检查方法, 为下一版中国药典修订已收载的精蛋白胰岛素注射液无菌检查方法提供了实验依据。

关键词: 精蛋白; 精蛋白胰岛素注射液; 肝素钠; 无菌检查; 薄膜过滤; 方法适用性试验

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1102-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.015

引用本文: 张光华, 江志杰, 刘文杰. 精蛋白胰岛素注射液无菌检查方法的建立[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1102-1105.

Establishment of the Sterility Test Method for Protamine Insulin Injection

ZHANG Guanghua, JIANG Zhijie*, LIU Wenjie(*Beijing Institute for Drug Control, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for sterility test of insulin protamine injection. **METHODS** The method suitability test was performed according to the sterility test method in General Chapter 1101 of Chinese Pharmacopoeia 2015 Volume IV. And optimized the sterility test method of protamine insulin injection included in the Pharmacopoeia. The protamine insulin injection was neutralized with heparin sodium solution without microbial toxicity, so that the protamine insulin injection changed from white suspension to clear and transparent liquid, which was convenient for membrane filtration method. **RESULTS** Using membrane filtration method, all six positive control test strains could grow normally in the suitability test of sterility test method. **CONCLUSION** A feasible sterility test method for protamine insulin injection is established, which provides an experimental basis for the revision of the sterility test method for protamine insulin injection included in the next edition of Pharmacopoeia.

KEYWORDS: protamine; protamine insulin injection; heparin sodium; sterility test; membrane filtration; suitability of the test method

目前市场上糖尿病治疗使用较多的胰岛素注射液主要包括: ①起效快、持续时间短的速度制剂; ②释药曲线相对平稳、持续时间能达到 24 h 或者更长的中效或长效制剂; ③将速效和中效制剂混合成持续作用时间长的双时相胰岛素制剂^[1]。其中②和③的延时制剂处方中, 在含有少量锌离子和苯酚或苯酚衍生物的中性条件下, 带负电荷的胰岛素与带正电荷的硫酸鱼精蛋白结合形成棒状晶型的白色沉淀, 在人体液中溶解度降低从而达到延时释放的目的^[2]。如精蛋白锌胰岛素注射液为含有鱼精蛋白与氯化锌的胰岛素(猪或牛)的灭菌混悬液, 每 100 U 中含鱼精蛋白 1.0~1.5 mg 与锌 0.2~0.25 mg^[1], 是一种具有延缓释放作用^[1]的动物胰岛素制剂。因注射液中含有一定量的精蛋白, 溶液一般为白色或类白色的悬浮液。无菌检查法

是保障无菌制剂安全性的重要方法^[3], 中国药典 2015 年版收载的精蛋白重组人胰岛素注射液、精蛋白锌胰岛素注射液、精蛋白锌胰岛素注射液(30R)无菌检查方法均为: 取本品, 加 1% 无菌抗坏血酸溶液 100 mL, 振摇使溶液澄清后, 经薄膜过滤法处理, 依法检查(通则 1101), 应符合规定, 但 1% 抗坏血酸溶液对微生物的毒性没有文献报道。本研究考察了无菌 1% 抗坏血酸溶液对微生物的毒性, 发现其对验证细菌有一定的毒性。根据产品的特性, 设计利用肝素钠对鱼精蛋白的中和作用, 使白色混悬液变为澄清透明的液体, 方便薄膜过滤, 并依照中国药典 2015 年版四部无菌检查法(通则 1101)中的规定, 采用中和剂和薄膜过滤法联合进行无菌检查方法适用性试验^[4], 考察了作为中和剂的含肝素钠 60 U·mL⁻¹ 的无菌 0.9% 氯化钠

作者简介: 张光华, 女, 副主任药师 Tel: 18010281179 E-mail: jiangzhijie@126.com *通信作者: 江志杰, 男, 副主任药师 Tel: 18010281179 E-mail: jiangzhijie@126.com

溶液的有效性以及对微生物的毒性,建立了有效的含精蛋白的胰岛素注射液的无菌检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HTY-CZ1806B 无菌隔离器、HTY-2000A 集菌仪、KDGB330 一次性使用的全封闭三联集菌培养器均来自杭州泰林生物技术设备有限公司;KB720 生化培养箱(德国 Binder);XG1.DMXD-0.36 电热脉动真空灭菌器(山东新华);热电 1300 Series A2 生物安全柜(Thermo);YX930D 电动吸引器(上海斯曼峰)。

1.2 样品

样品 1: 精蛋白重组人胰岛素注射液[重和林 N, 批号: 588025, 658007; 规格: 3 mL: 300 IU(笔芯)], 由 BIOTON S.A.生产; 样品 2: 精蛋白重组人胰岛素注射液(预混 30/70, 重和林 M30, 批号: 668019, 618011; 规格: 3 mL: 300 IU(笔芯)], 由 BIOTON S.A.生产; 样品 3: 精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液[25R, 批号: 621803031; 规格: 3 mL: 300 U(笔芯)], 由甘李药业股份有限公司生产。

1.3 试验菌种

枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* CMCC(B) 63501]、大肠埃希菌 [*Escherichia coli* CMCC(B) 44102]、铜绿假单胞菌 [*Pseudomonas aeruginosa* CMCC(B)10104]、金黄色葡萄球菌 [*Staphylococcus aureus* CMCC(B)26003]、生孢梭菌 [*Clostridium sporogenes* CMCC(B)64941]、白色念珠菌 [*Candida albicans* CMCC(F)98001]、黑曲霉 [*Aspergillus niger* CMCC98003]均来自中国食品药品检定研究院医学微生物菌种保藏中心。

1.4 培养基和试剂

硫乙醇酸盐流体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液均购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司); 肝素钠(上海麦克林生化科技有限公司); 抗坏血酸(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 菌落制备和计数

按中国药典 2015 年版四部无菌检查法(通则 1101)进行^[4], 结果见表 1。

2.2 培养基的适用性检查

无菌性检查按中国药典 2015 年版四部无菌检查法(通则 1101)进行^[4], 结果符合规定。灵敏度检查按中国药典 2015 年版四部无菌检查法(通则 1101)进行^[4], 结果符合规定。

表 1 菌落计数结果

计数	cfu·mL ⁻¹						
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	生孢梭菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
1	45	31	28	16	30	30	29
2	42	34	25	18	32	35	31
平均	44	32	26	17	31	32	30

2.3 中和剂与胰岛素注射液的相互作用试验

选择含肝素钠 100 mg($\geq 18\ 000\ U$)的无菌 0.9%氯化钠溶液 300 mL($60\ U\cdot mL^{-1}$), 与中国药典 2015 年版收录的无菌检查方法中含 1%抗坏血酸的无菌溶液 100 mL 相比较, 2 种溶液与胰岛素作用一定时间后均能完全澄清, 表明 2 种溶液均有效, 见表 2。

表 2 中和剂溶液与精蛋白胰岛素注射液的相互作用结果

Tab. 2 Interaction between neutralizer solution and protamine insulin injection

中和剂	体积/mL	样品量	混合后情况
含肝素钠($60\ U\cdot mL^{-1}$)的无菌 0.9%氯化钠溶液	300	30 支, 规格: 3 mL: 300 U;	完全澄清
含 1%抗坏血酸的无菌溶液	100	10 mL: 400 U	完全澄清

2.4 中和剂对微生物的毒性实验

菌液组: 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL, 分别加入制备好的试验菌液 0.1 mL ($300\sim 600\ cfu$), 混匀, 静置 30 min, 使每 1 mL 稀释液中含菌量为 $30\sim 100\ cfu$ 。分别取此菌液 1 mL, 采用薄膜过滤法, 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液为冲洗液(每膜 $\geq 100\ mL$), 进行细菌计数、霉菌和酵母菌计数(各试验菌株分别进行)。

中和剂对照组: 取含肝素钠 $60\ U\cdot mL^{-1}$ 的无菌 0.9%氯化钠溶液和含 1%抗坏血酸的无菌溶液各 10 mL, 分别加入制备好的试验菌液 0.1 mL ($300\sim 600\ cfu$), 混匀, 静置 30 min, 使每 1 mL 稀释液中含菌量为 $30\sim 100\ cfu$ 。分别取此液 1 mL, 采用薄膜过滤法, 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液为冲洗液(每膜 $\geq 100\ mL$), 进行细菌计数、霉菌和酵母菌计数(各试验菌株分别进行)。

金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆

菌的滤膜贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上,置 33 ℃ 培养 5 d, 逐日观察、计数, 生孢梭菌的滤膜加入 200 mL 硫乙醇酸盐流体培养基厌氧区中 33 ℃ 培养 24 h, 计数。白色念珠菌及黑曲霉的滤膜贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上, 置 23 ℃ 培养 5 d, 逐日观察、计数, 结果见表 3。

中国药典 2015 年版四部微生物计数法(通则 1105)^[4]指出若使用中和剂或灭活剂, 试验中应设中和剂或灭活剂对照组, 以确认其有效性和对微生物无毒性。中和剂或灭活剂对照组的菌落数与菌液对照组的菌落数比值应在 0.5~2 内。从表 3 结果来看, 回收比值①的最小回收率为 0.83, 均>0.5, 表明含肝素钠 60 U·mL⁻¹ 的溶液对微生物无毒性, 适合做中和剂。回收比值②中细菌回收比值均<0.5, 最小的回收率只有 0.05, 真菌回收率均>0.76, 表明含 1%抗坏血酸的溶液对细菌有一定的毒性, 不适合做中和剂。

2.5 方法适用性试验(薄膜过滤法)

取本品 30 支, 置含 18 000 U 肝素钠的 0.9% 无菌氯化钠注射液 300 mL 中, 振摇至溶液澄清, 薄膜过滤, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗(每膜≥300 mL), 按中国药典 2015 年版四部无菌检查

法(通则 1101)^[4]进行供试品组、阴性对照组、含供试品阳性对照菌、阳性对照组实验。结果见表 4~5。

2.6 结果

供试品组、阴性对照组均无菌生长, 含供试品阳性菌对照组各滤器中试验菌与阳性菌对照组比较均生长良好, 说明供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计, 上述检查方法可行, 根据供试品特性选择金黄色葡萄球菌为阳性对照菌。对精蛋白重组人胰岛素注射液(重和林 N)、精蛋白重组人胰岛素注射液(预混 30/70)(重和林 M30)、精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)样品平行实验, 结果一致。

通过本研究确立的含精蛋白的胰岛素注射液的无菌检查方法为: 取本品 30 支, 置含 18 000 U 肝素钠的 0.9% 无菌氯化钠注射液 300 mL 中, 振摇至溶液澄清, 薄膜过滤, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗(每膜≥300 mL), 以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌, 依法检查(中国药典 2015 年版四部通则 1101), 应符合规定。

含肝素钠 18 000 U 的无菌溶液配制: 称取肝素钠 100 mg, 加至 0.9% 氯化钠溶液 300 mL 中, 121 ℃ 15 min 灭菌。

表 3 中和剂作用后微生物回收比值

Tab. 3 Recovery rates for microorganism after neutralizer

中和剂	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	生孢梭菌	白色念珠菌	黑曲霉
pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液	60	67	42	29	60	34
含肝素钠 60 U·mL ⁻¹ 的 0.9% 氯化钠溶液①	62	64	41	24	60	29
含 1% 抗坏血酸的 0.9% 氯化钠溶液②	3	10	2	14	59	26
回收比值①	1.03	0.96	0.98	0.83	1.00	0.85
回收比值②	0.05	0.15	0.05	0.48	0.98	0.76

表 4 供试品组、阴性对照组培养结果

Tab. 4 Culture result of test group and negative control group

组别	培养基名称	培养时间/d													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
供试品组	硫乙醇酸盐流体培养基(33 ℃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	胰酪大豆胨液体培养基(23 ℃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阴性对照组	硫乙醇酸盐流体培养基(33 ℃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	胰酪大豆胨液体培养基(23 ℃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 5 阳性对照菌培养结果

Tab. 5 Culture results of positive control bacteria

培养基名称	菌种名称	含供试品阳性菌对照培养时间/d			阳性菌对照培养时间/d		
		1	2	3	1	2	3
硫乙醇酸盐流体培养基(33 ℃)	金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+
	大肠埃希菌	+	+	+	+	+	+
	生孢梭菌	+	+	+	+	+	+
胰酪大豆胨液体培养基(23 ℃)	枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+
	白色念珠菌	-	+	+	-	+	+
	黑曲霉	-	+	+	-	+	+

3 讨论

3.1 在无菌检查中, 如何考察中和剂对微生物的无毒性

药典规定无菌试验过程中, 若需使用表面活性剂、灭活剂、中和剂等试剂, 应证明其有效性, 且对微生物无毒性。在方法学适用性过程中中和剂的有效性很容易理解, 但如何开展对微生物无毒性的试验呢? 中国药典 2015 年版中并没有明确规定, 目前基本上是增加中和剂对照组^[5-12], 观察微生物有无生长, 也有参照微生物限度方法学适用性的方式把微生物添加到含中和剂的液体中, 作用一定时间后, 检测微生物的存活率^[13]。笔者认为采用后者定量比前者定性要更科学、更合理。本研究采用了肝素钠作为中和剂, 通过后者的定量试验发现, 微生物的回收率均 >0.5 , 很好地说明肝素钠溶液对考察的微生物没有毒性, 同时考察的 1%抗坏血酸溶液的细菌回收率均 <0.5 , 说明其对细菌有一定毒性, 但假如仅增加中和剂对照组, 采用定性的方式考察, 在阳性菌数值大时, 液体培养基中的细菌可能也生长良好, 无法真实反映其对微生物的毒性。

3.2 特殊品种建立无菌检查法的策略

根据中国药典 2015 年版四部通则 1101 无菌检查法的要求, 无菌检查法包括直接接种法和薄膜过滤法。由于薄膜过滤法采用大量取样集菌的方法, 具有代表性, 不易漏检, 仪器操作简单, 该系统是全封闭过滤系统, 避免了操作过程中外源性细菌的污染, 对试验结果的可靠性影响较小^[13]。但有些品种因为自身的抑菌作用很大, 需要找中和剂, 有的因为辅料的原因, 需要找相应的稀释剂, 有的因为本身是混浊液, 需要找使之澄清的物质。含精蛋白的胰岛素注射液每 100 U 中含有鱼精蛋白约 1.0~1.5 mg^[15], 每 1 mg 鱼精蛋白可以中和的肝素抗血凝作用 $>100 \text{ U}^{[4]}$ 。无菌检查 1 次的检验量为 30 支, 所含鱼精蛋白总量约为 90~180 mg, 实验设计选用含肝素钠 18 000 U 的无菌 0.9%氯化钠溶液 300 mL 为稀释剂, 足以中和胰岛素注射液中所含的鱼精蛋白, 使白色混悬液变为澄清透明的液体, 方便薄膜过滤, 既消除了精蛋白胰岛素注射液中含有防腐剂的抑菌作用, 又便于观察结果。而中国药典 2015 年版收载的精蛋白重组人胰岛素注射液、精蛋白锌胰岛素注射液、精蛋白锌胰岛素注射液(30R)无菌检查方法中 1%

无菌抗坏血酸溶液 100 mL 的作用是使鱼精蛋白在酸性条件下溶解度增加, 但通过细菌定量回收率判断发现, 1%无菌抗坏血酸溶液对细菌有一定的毒性。1%无菌抗坏血酸溶液的 pH 值为 2.72, 分析其对细菌的毒性可能与其 pH 值偏低相关。由于 1%无菌抗坏血酸溶液对细菌有毒性, 不符合中国药典对稀释剂和中和剂的要求。因此本研究开发的含精蛋白胰岛素注射液的无菌检查方法具有重要意义。

REFERENCES

- [1] NORRMAN M, HUBÁLEK F, SCHLUCKEBIER G. Structural characterization of insulin NPH formulations [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30(5): 414-423.
- [2] ZHU C C, QIAO D S, TU J S. Determination of protamine sulphate in protamine insulin injection by RP-HPLC [J]. *Pharm Biotechnol(药物生物技术)*, 2008, 15(3): 212-215.
- [3] CHEN L P, YANG X L, LI H. Study on establishment and optimization of the sterility test method for itraconazole iv [J]. *Pharm Biotechnol(药物生物技术)*, 2016, 23(1): 62-64.
- [4] 中国药典. 四部[S]. 2015: 136-137.
- [5] TAN Q T, YAN J, ZHONG G X, et al. Validation for sterility test method of nitroglycerin ointment [J]. *J Pharm Pract(药学实践杂志)*, 2015, 33(3): 253-254.
- [6] LI H, LI X, ZHANG Y J. Confirmation study on the sterility method of the pefloxacin mesylate for injection [J]. *Chin J Antibiot(中国抗生素杂志)*, 2017, 42(6): 531-533.
- [7] LIANG Y Q, LIU T, ZHU B, et al. Selection of positive ion used for sterility test of quinolones [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2009, 29(2): 334-336.
- [8] LIU D, TANG C M. Establishment and validation of the method of sterility test for enoxacin gluconate injection [J]. *China Pharm(中国药房)*, 2015, 26(9): 1263-1265.
- [9] XIA T, CUI Y, LI H D, et al. The suitability test of sterility test for Metronidazole and Sodium Chloride Injection [J]. *China Med Her(中国医药导报)*, 2018, 15(24): 121-124, 128.
- [10] MA S H, XIAO H, YUAN Y, et al. Establishment of the sterility test method for posaconazole injection [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2018, 38(9): 1568-1572.
- [11] 于荣, 张英, 曲萍. 红霉素软膏无菌检查的方法验证[J]. *山西职工医学院学报*, 2009, 19(2): 62-63.
- [12] CHEN L P, LI C, YANG X L. Study on establishment and optimization of the sterility test method for tigecycline for injection [J]. *Pharm Biotechnol(药物生物技术)*, 2015, 22(5): 428-431.
- [13] ZHANG G H, JIANG Z J, LIU W J, et al. Establishment of the sterility test method for Minocycline Hydrochloride Ointment [J]. *Cap Food Med(首都食品与医药)*, 2019, 26(2): 162-164.
- [14] LIU Q, ZHANG H Y, WANG L, et al. Comparison of applicability test of sterile examination method for artemether injection [J]. *China Pharm(中国药师)*, 2017, 20(10): 1874-1876.
- [15] DING X L, SONG M, ZHANG H, et al. Study on determination of protamine sulfate in protamine zinc insulin injection [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32(4): 679-681.

收稿日期: 2019-07-15

(本文责编: 沈倩)